

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Katrin Orro

**RNA polümeraas II subühiku Rpb9 roll heterokromatiini vaigistamisel
pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae***

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendaja MSc Henel Sein

TARTU 2018

INFOLEHT

RNA polümeraas II subühiku Rpb9 roll heterokromatiini vaigistamisel pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae*

Rpb9 on RNA polümeraas II subühik, mille deletsioon pole letaalne. Vajalik on see siiski transkriptsiooni initsiatsioonil, DNA reparatsioonil ja polümeraasi täpsuse tagamisel. See töö näitab, et Rpb9 N-terminus vastutab ka normaalse vaigistamise eest pärmi ribosomaalse DNA lookuse ja telomeeride juures. Paardumistüübi lookuse vaigistamist Rpb9 ei mõjuta.

Märksõnad: pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae*, RNA polümeraas II subühik Rpb9, transkriptsiooniline vaigistamine

CERCS kood: P310 (proteiinid, ensümolooogia)

The role of RNA polymerase II subunit Rpb9 in heterochromatin silencing in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Deletion of Rpb9, subunit of RNA polymerase II, is not lethal. Nevertheless, it is important for transcription initiation, reparation and fidelity. Current work shows the importance of Rpb9 N-terminus in transcriptional silencing. N-terminus deletion causes defective silencing at rDNA and telomere but not at mating-type loci.

Keywords: budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, RNA polymerase II subunit Rpb9, transcriptional silencing

CERCS code: P310 (proteins, enzymology)

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. DNA-sõltuv RNA polümeraas II	6
1.2. RNA polümeraas II subühik 9 – Rpb9.....	8
1.2.1. Rpb9 roll transkriptsiooni initsiatsioonis.....	8
1.2.2. Rpb9 roll transkriptsiooni elongatsioonis.....	9
1.2.3. Rpb9 roll teistes rakulistes protsessides	9
1.3. Transkriptsiooniline vaigistamine pagaripärmis <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.3.1. Vaigistamine paardumistüübi lookuses	10
1.3.2. Vaigistamine telomeersetel aladel	11
1.3.3. Vaigistamine ribosomaalse DNA (rDNA) aladel.....	11
2. EKSPERIMENTAALOSA	13
2.1. Töö eesmärk.....	13
2.2. Materjal ja metoodika	13
2.2.1. Kasutatud söötmed	13
2.2.2. Kasutatud tüved ja plasmiidid	13
2.2.3. PCR plasmidi Rpb9-NatMX pealt ja sadestamine	14
2.2.4. Transformeerimine elektroporatsiooniga	15
2.2.5. Genoomse DNA eraldamine pärmis kolooniast ja transformeerunud kolooniate kontrollimine	16
2.2.6. Vaigistamise uurimine ja lahjenduskülvid	16
2.3. Tulemused.....	17
2.3.1. Erineva pikkusega deletsioonitüvede konstrueerimine	17
2.3.2. Transkriptsiooniline vaigistamine paardumistüübi lookuses erinevate deletsioonidega rakkudes	19
2.3.3. Transkriptsiooniline vaigistamine telomeerses lookuses erinevate deletsioonidega rakkudes	20
2.3.4. Transkriptsiooniline vaigistamine ribosomaalse DNA lookuses erinevate deletsioonidega rakkudes	21
KOKKUVÕTE	22
SUMMARY	23
KIRJANDUSE LOETELU.....	24
LIHTLITSENTS.....	29

KASUTATUD LÜHENDID

5-FoA – *5-Fluoroorotic Acid*

DTT – *dithiothreitol*; ditiotreitol

EC – *elongation complex*; elongatsiooni kompleks

EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*; etüleendiamiintetraatsetaat

GTF – *general transcription factors*; üldised transkriptsioonifaktorid

HML ja HMR – *Hidden MAT Left* (peidetud MAT vasak) ja *Hidden MAT Right* (peidetud MAT parem)

MAT – *mating-type*; paardumistüüp

NAT – *nourseothricin N-acetyl transferase*; NTC resistentsusgeen

NTC – *nourseothricin*; aminoglükosiidne antibiootikum

PIC – *preinitiation complex*; preinitsiatsioonikompleks

RENT – *regulator of nucleolar silencing and telophase exit*

RNAP I/RNAP II/RNAP III – RNA polümeraas I/II/III

SC – *synthetic complete*; sünteetiline täissööde

SDS – *sodium dodecyl sulfate*; naatriumdodetsüülsulfaat

Sir – *silent information regulator*; vaigistatud informatsiooni regulaator

TBP – *TATA-binding proteiin*; TATA-le kinnituv valk

TCR – *transcription coupled repair*; transkriptsiooniseoseline reparatsioon

YPD – *yeast extract, peptone, dextrose*; pärmiekstrakt-peptoonsööde

SISSEJUHATUS

DNA-sõltuval RNA polümeraasil (RNAP II) on peamine osa valgugeenide transkriptsioonis sünteesides DNA pealt mRNA jm. Valgukompleksi moodustab 12 subühikut. Rpb9, mis on üks väiksemaid subühikuid, pole mRNA sünteesiks absoluutselt vajalik, kuid selle 122-aminohappelise valgu deletsioon tekitab pärmile siiski mitmeid probleeme.

Pagaripärmi kromatiini transkriptsiooniline vaigistamine on tähtis protsess, mis toimub kolmes lookuses: rDNA, telomeeride ja paardumistüübi lookuses. *Saccharomyces cerevisiae* on vaigistamise uurimiseks kaua kasutatud mudel võimaldades erinevate markergeenide viimist vaigistatud lookustesse. Nende avaldumine näitab seega vaigistamise anomaaliat. Pärmis transkriptsioonilist vaigistamist võib võrrelda imetajate heterokromatiiniga.

Antud töö sai aluse, kui märgati, et *rpb9Δ* tüvel on raskusi vaigistamisega. Otsustati uurida, milline osa antud subühikust on normaalse vaigistamise eest vastutav.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

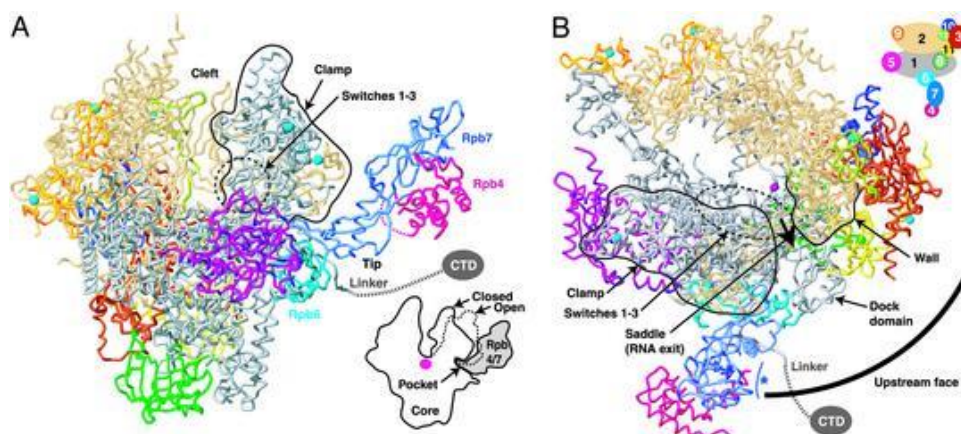
1.1. DNA-sõltuv RNA polümeraas II

Iga raku eluks on vajalik geenide ekspressioon. Sellest peamine roll on transkriptsioonil, mille masinavärgis on üks olulisim RNA polümeraas (RNAP).

Eukarüootsetes rakkudes esineb kolme erinevat DNA-sõltuvat RNA polümeraasi. RNAP I transkribeerib rRNA geene, RNAP II mRNA, miRNA ja snRNA geene ning RNAP III tRNA ja 5S rRNA geene. Kõigil kolmel polümeraasil esineb konserveerunud alu, kuid erinevad aminohappelises koostises ja valgu pikkuses. Prokarüootsetes rakkudes seevastu on vaid üks RNAP.

RNAP II on suur 550 kDa valgukompleks, mis nii pagaripärmil kui ka inimesel koosneb 12 subühikust (pagaripärmil tähistatud Rpb1 kuni Rpb12). Kusjuures isoleeritud on RNAP II kahes vormis – „complete“ ja „core“. „Complete“ märgib RNAP II kõigi 12 subühikuga ja „core“ 10 subühikuga ehk ilma heterodimeeri moodustavate Rpb4 ja Rpb7-ta. Ilma selle heterodimeerita on RNAP II defektne transkriptsiooni initsiatsioon, selle lisamisel aga initsiatsioonivõime taastub. Seega võib öelda, et Rpb4 ja Rpb7 on justkui transkriptsiooniks vajalikud GTF-id (*general transcription factors*; üldised transkriptsioonifaktorid). (Bushnell ja Kornberg, 2003; Edwards et al., 1991; McKune et al., 1993)

Kaks suuremat subühikut, Rpb1 ja Rpb2, moodustavad RNAP II keskel oleva „lõhe“, kuhu DNA saab siseneda. Lõhes paikneb ensüümi aktiivtsenter ja selle ühes otsas valguline sein ehk „wall“. Lõhe ühe ääre moodustab „clamp“ ehk mobiilne element, mis põhjustab avatud ja suletud vormi (joonis 1).



Joonis 1. 12-subühikulise RNAP II struktuur. (A) Vaade „eestvaates“ ehk vaade otse „lõhesse“. (B) Vaade „kõrvaltvaates“. Subühikute värvikood on toodud ülal paremal. Musta joonega on ääristatud „clamp“. Punktiirina on tähistatud CTD „linker“. „Walli“ ja „clampi“ vaheline nool näitab eeldatavat RNA väljumissuunda. (Armache et al., 2003)

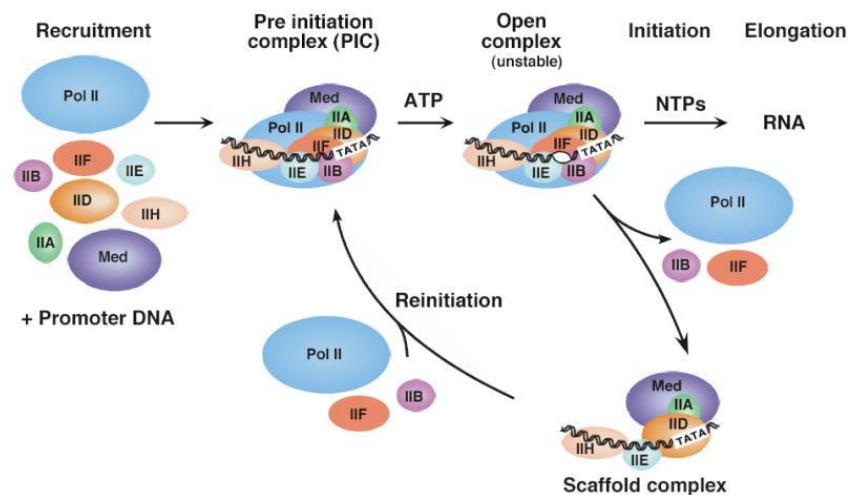
RNAP II vajab transkriptsiooniks GTF-e, ilma nendeta ei toimu transkriptsiooni initsiatsiooni (Matsui et al., 1980). GTF-idest tulenevat signaali vahendab RNAP II-le suur mediaator kompleks (Allen ja Taatjes, 2015).

PIC (*preinitiation complex*; preinitsiatsioonikompleks) kompleksi moodustumine on vajalik transkriptsiooni toimumiseks – sinna kuuluvad RNAP II, GTF-id (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF ja TFIIH) aga ka koaktivaatorid, korepressorid jt (Gupta et al., 2016).

Esimesena seondub promootorile TFIID. TFIID sisaldab TBP-d (*TATA-binding protein*; TATA-le kinnituv valk), mis seondub TATA boxile ja väänab DNA-d 80 kraadi võrra, ning TBP-ga seonduvaid faktoreid (Lee ja Young, 2000).

Järgmisena seonduvad TFIIA ja TFIIB ning seejärel ka RNAP II/TFIIF kompleks. PIC kompleks on valmis kui seonduvad ka TFIIE ja TFIIH. Edasi harutub lahti DNA promootorala ATP-sõltuvalt – moodustub DNA mull (*DNA bubble*). Kui RNAP II on jõudnud sünteesida kriitilise pikkusega mRNA, vabaneb see promootorilt ja moodustub stabiilne EC (*elongation complex*; elongatsiooni kompleks). Initsiatsiooniks vajalikud faktorid vahetuvad elongatsiooni faktorite vastu. (Gupta et al., 2016; Hantsche ja Cramer, 2016; Lee ja Young, 2000; Thomas ja Chiang, 2006)

Kui RNAP II on initsieerinud transkriptsiooni, jäävad promootor alale alles mediaator, TFIID, TFIIA, TFIIH ja TFIIE, et reinitseerida transkriptsioon uue RNAP II-ga. Seega on reinitseatsioon kiirem kui initsiatsioon (joonis 2). (Yudkovsky et al., 2000)



Joonis 2. RNAP II initsiatsiooni ja reinitseerimise rada. Kujutatud on PIC kompleksi moodustumine. DNA promootorale seonduvad RNAP II (Pol II), transkriptsioonifaktorid TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF ja TFIIH ning mediaatorikompleks. ATP-sõltuvalt harutub DNA lahti. RNAP II initsieerub ja nukleotiidid lülitakse RNA ahelasse. Promootorale jäävad alles mediaator, TFIIA, TFIID, TFIIE ning TFIIH. Reinitseatsioon toimub, kui promootorale seonduvad RNAP II, TFIIB ja TFIIF. (Hahn, 2004)

1.2. RNA polümeraas II subühik 9 – Rpb9

Rpb9 on pagaripärmi RNA polümeraas II väike 14 kDa-line subühik pikkusega 112 aminohapet. Rpb9 paikneb RNAP II struktuuris Rpb2 subühiku, mis moodustab lõhe ülemise ääre, juures.

Rpb9 sisaldab kahte tsinkdomeeni $CX_2CX_nCX_2C$ motiiviga. C-terminuses paiknev tsinkdomeen on väga sarnane TFIIS-is (elongatsiooni faktor) sisalduva tsinkdomeeniga. (Kaine et al., 1994)

Rpb9 on vajalik transkriptsioonil initsiatsiooni alguspunkti valimiseks, RNAP II täpsuse tagamiseks ja transkriptsiooniseoseliseks DNA reparatsiooniks (Hull et al., 1995; Li et al., 2006a; Nesser et al., 2006). Pagaripärmil asub *RPB9* geen ainsa koopiana 7. kromosoomis ning on omane vaid RNAP II-le (Woychik et al., 1991). Eukarüootide seas on Rpb9, täpsemalt selle kaks tsinkdomeeni, kõrgelt konserveerunud (Acker et al., 1993). Inimese RNAP II subühik hsRpb9, mis on pagaripärmi Rpb9 homoloog, on võimeline pärmi *rpb9Δ* rakkudes taastama kasvu kõrgel temperatuuril ning defektse initsiatsiooni alguskoha valimise (McKune et al., 1995). Äädikakärbsel on *rpb9Δ* letaalne (Harrison et al., 1992).

Rpb9 pole otseselt vajalik mRNA sünteesiks, kuid geeni deletsioon võib siiski olla letaalne mitteoptimaalsetes tingimustes. Sama kehtib ka Rpb4 kohta. (Woychik ja Young, 1989; Woychik et al., 1991)

Rpb9Δ ei põhjusta teiste subühikute defektset kokkupanekut (Hull et al., 1995).

1.2.1. Rpb9 roll transkriptsiooni initsiatsioonis

Nii *rpb9Δ* kui ka punktmutatsioon, mis viib aminohappe vahetuseni tsüsteiinilt fenüülalaniiniks tsinkdomeenis, põhjustab *upstream* initsiatsioonisaitide kasutamist. Kusjuures nendeks saitideks võivad olla täiesti uued või harva kasutatavad järjestused. (Furter-Graves et al., 1994; Hull et al., 1995)

Võib arvata, et Rpb9 puudumine mõjutab PIC kompleksis Rpb9 naabruses oleva TFIIF aktiivsust, mis on tähtis transkriptsiooni initsiatsiooniks. Osa TFIIF-st on polümeraasi aktiivtsentri läheduses TFIIB juures. On pakutud, et just TFIIB tunneb ära initsiatsioonisaide ning TFIIF on selleks protsessiks vajalik. (Ziegler et al., 2003)

1.2.2. Rpb9 roll transkriptsiooni elongatsioonis

RNAP II võib transkriptsiooni läbi viies DNA-l peatuda. Põhjuseks võib olla nii DNA järjestus kui ka valgud, mis DNA-le seondununa blokeerivad polümeraasi füüsiliselt. *Rpb9Δ* rakud võrreldes metsiktüüpi rakkudega on vähem võimelised reageerima TFIIS-le, mis peaks stimuleerima arrestist väljatulekut. Näidatud on Rpb9 C-terminaalse tsinkdomeeni olulisust TFIIS signaali äratundmiseks (Hemming ja Edwards, 2000). Arrestist välja tulekuks on vaja aktiveerida polümeraasi 3'-5' nukleasne aktiivsus. Just seda TFIIS teebki ning Rpb9 omakorda võimendab (Koyama et al., 2007). Ilma Rpb9-ta RNAP II ei arrestu nii tihti kui metsiktüüpi polümeraas. Seega on Rpb9 vajalik nii arrestumiseks kui ka sellest välja tulekuks (Awrey et al., 1997)

Rpb9 seostatakse ka RNAP II täpsusega. On näidatud, et *rpb9Δ* põhjustab märkimisväärselt transkriptsiooni täpsuse langust. (Nesser et al., 2006; Walmacq et al., 2009)

1.2.3. Rpb9 roll teistes rakulistes protsessides

Pagaripärmil esineb kaks TCR-i (*transcription coupled repair*; transkriptsiooniseoseline reparatsioon) alamrada. Üks nendest on rad26-sõltuv (van Gool et al., 1994) ja teine Rpb9-sõltuv (Li ja Smerdon, 2002).

Rad26-sõltuv TCR on sama efektiivne nii kodeerivas kui ka *upstream* regioonis. Rpb9-sõltuv parandamine on aga tõhusam kodeerivas regioonis. Oluline roll on aga Rpb4-l, mis reguleerib kahte TCR-i alamrada. Rad26-sõltuvat TCR-i Rpb4 aktiveerib ja Rpb9-sõltuvat represserib. (Li ja Smerdon, 2002). Esineb alamradade erinev efektiivsus erinevates geenides (Li ja Smerdon, 2004). Rpb9-sõltuv TCR esineb vaid transkribeeritud ahelas. TATA ja UAS järjestuse olemasolu on vajalik efektiivseks reparatsiooniks. (Li et al., 2006b)

UV-kiirgusest tulenevate kahjustuste tõttu ubikvitineeritakse RNAP II suurim subühik Rpb1. Seejärel see lagundatakse. Rpb9 on selle protsessi juures tähtis stimuleerija. Rpb9 selline aktiivsus ei ole seotud ei Rpb9-sõltuvast ega ka rad26-sõltuvast TCR-ist. (Chen et al., 2007)

1.3. Transkriptsiooniline vaigistamine pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae*

Transkriptsiooniline vaigistamine tähendab, et geeni pealt ei toimu transkriptsiooni. Kusjuures oluline on vaid geeni asukoht kromosoomis ja mitte geen ise. Seega, transkriptsiooniline vaigistamine ei ole sama mis geeni promootori maha surumine. Pärmi vaigistatud alad sarnanevad näiteks imetajate heterokromatiinile. (Rusche et al., 2003)

Pagaripärmis toimub vaigistamine kolmes kohas: paardumistüübi lookuses, telomeeridel ja rDNA aladel (joonis 4). Vaigistatud aladel on histoonid H3 ja H4 hüpoatsetüleeritud (Braunstein et al., 1993). Tähtis osa on Sir (*silent information regulator*; vaigistatud informatsiooni regulaator) perekonna valkudel. Hüpoatsetüleeritud histoonid ja Sir valgud loovad kompakse struktuuri, mille pealt transkriptsiooni toimuda ei saa (Rusche et al., 2003). Sir perekonna valk Sir2 on vajalik kõigi kolme ala vaigistamiseks pärmis, olles histoonide deatsetülaas (Kimmerly ja Rine, 1987; Madhani, 2007; Smith ja Boeke, 1997).

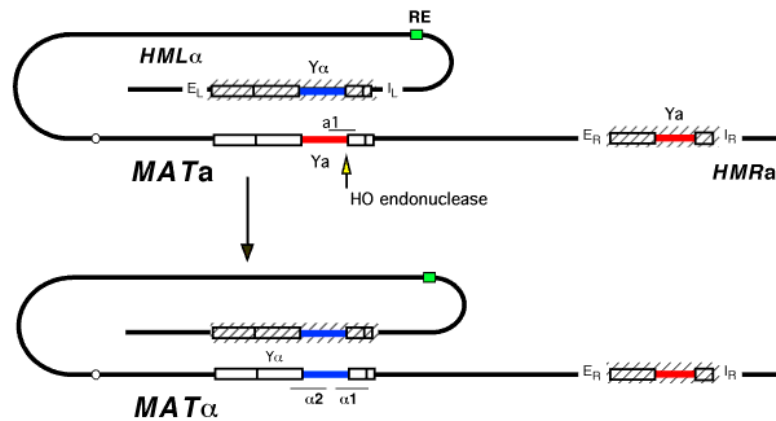
1.3.1. Vaigistamine paardumistüübi lookuses

Pagaripärm võib omada kahte erinevat paardumistüüpi: *a* või α . Tähistakse neid vastavalt *MATa* ja *MAT α* . Kas rakk omab *a* või α paardumistüüpi oleneb sellest, kumb alleel on avaldunud *MAT* (*mating-type*; paardumistüüp) lookuses. Kahe erineva paardumistüübiga haploidsed rakud võivad paarduda ning moodustub *MATa/MAT α* diploidne rakk, mis enam paarduda ei saa. Diploidne rakk võib ebasoodsates keskkonnatingimustes jaguneda meioosi teel – moodustub eoskott, mis sisaldab kahte *MATa* ja kahte *MAT α* paardumistüüpiga spoori. (Haber, 2012; Klar, 2010; Madhani, 2007)

Igal pärmirakul on olemas informatsioon mõlema paardumistüübi kohta. 3. kromosoomis asub *MAT* lookus ja sellest vasakul paikneb *HML* (*Hidden MAT Left*; peidetud *MAT* vasak) ehk α alleel ning paremal *HMR* (*Hidden MAT Right*; peidetud *MAT* parem) ehk *a* alleel. Kui *MAT* lookuses on avaldunud näiteks *a*, siis nii *HML* kui ka *HMR* on samal ajal vaigistatud. Pärmirakud suudavad oma paardumistüüpi muuta iga põlvkonna järel. Selleks on vaja *HO* endonukleaasi, mis teeb *MAT* lookusesse kaheaahelalise katke. Seejärel lagundavad eksonukleasid kogu *MAT* lookuses olnud informatsiooni ning homoloogilist rekombinatsiooni läbiviivad ensüümid kopeerivad teise vaigistatud alleeli *MAT* lookusesse. Laboritüved ei sisalda *HO* geeni ning seega oma paardumistüüpi muuta ei saa. (Haber, 2012; Madhani, 2007)

HML ja *HMR* mõlemas otsas paiknevad *silencer* ehk vaigistamisjärestused. Tähistatakse neid vastavalt *E_L* ja *I_L* ning *E_R* ja *I_R* (*E* – *essential*; *I* – *important*). Nendele järjestustele kinnituvad mitmed valgud (*ORC*, *Rap1*, *Abf1*), mis kaasavad omakorda Sir-perekonna valgud. Sir-kompleks (sisaldab Sir2, Sir3 ja Sir4) levib mööda kromatiini edasi ja Sir2 deatsetüleerib histoonid (joonis 4A). (Madhani, 2007; Rusche et al., 2003)

Varasemalt on näidatud, et kui pikendada kahe *silencer*'i vahelist ala mõne siseseviidava geeniga, võib vaigistamise tase alaneda (Haber, 2012; Weinstock et al., 1990).



Joonis 3. MAT, HML ja HMR paiknemine 3. kromosoomis. Kujutatud on paardumistüübi vahetust MATa-lt MAT α -ks. Viirutatud alad on vaigistatud. RE (*recombination enhancer*; rekombinatsiooni võimendaja) soodustab HML kasutamist doonorina rekombinatsioonil. (Haber, 2012)

1.3.2. Vaigistamine telomeersetel aladel

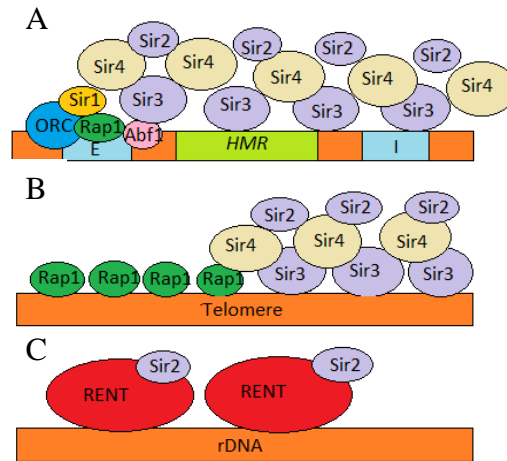
Võrreldes paardumistüübi-seoselise vaigistamisega on telomeerne vaigistamine palju robustsem. Mitmed mutatsioonid, mis mõjutavad vaigistamist telomeeride lähedal, ei oma mingit tähtsust paardumistüübi vaigistamisel. (Haber, 2012; Vandre et al., 2008)

Telomeeridel ei esine *silencer* järjestust. Vaigistamise initsieerib valk Rap1 – oluline ka paardumistüübi vaigistamise juures –, mis tunneb spetsiifiliselt ära telomeeride korduvad järjestused. Taas seondub Sir-kompleks, mis vaigistab telomeerid liikudes kordusjärjestustest eemale kromatiini keskosa poole (joonis 4B). (Haber, 2012; Madhani, 2007)

1.3.3. Vaigistamine ribosomaalse DNA (rDNA) aladel

Pagaripärmis on 100-200 rDNA koopiat. Kõik nad asuvad 12. kromosoomis ja võtavad enda alla 60% kromosoomist ning 10% kogu genoomist. (Kobayashi et al., 1998; Petes ja Botstein, 1977). Nende alade vaigistamine on äärmiselt oluline – ei tohi toimuda homoloogilist rekombinatsiooni, mis põhjustab koopiaarvu muutust (Kobayashi, 2006). Ribosomaalse DNA alad on pärmis genoomi kõige ebastabiilsemad ning on näidatud, et rDNA strabiilsus mõjutab pärmis eluiga. Kui metsiktüüpi „ema rakk“ (*mother cell*) suudab punguda umbes 20 korda, siis ebastabiilse rDNA-ga tüve oma mitu korda vähem. Kobayashi on toonud selle nähtuse selgituseks neli omavahel põimunud protsessi: ebastabiilne rDNA põhjustab DNA reparatsiooni ensüümide akumulatsiooni rDNA lookuses; DNA reparatsiooni ensüümide kontsentratsioon mujal piirkondades langeb, mistõttu kogu genoomi stabiilsus alaneb; rakutsükkel blokeeritakse; raku kasv peatub. (Kobayashi, 2008, 2011)

Sir2 osaleb rDNA vaigistamisel olles osa RENT (*regulator of nucleolar silencing and telophase exit*) kompleksist, mis sisaldab lisaks valke Net1 ja Cdc14 (joonis 4C). Sir-kompleks siin ei osale. (Huang ja Moazed, 2003)



Joonis 4. Vaigistamine kolmes eri lookuses. (A) Vaigistamine paardumistüübi lookuses. *Silencer*'ile kinnituvad ORC, Rap1 ja Abf1, mis omakorda kaasavad Sir-kompleksi. Sir2 deatsetüleerib histoonid. (B) Vaigistamine telomeeride juures. Rap1 seondub telomeeride kordusjärjestustele ja kaasab Sir-kompleksi. (C) Vaigistamine rDNA lookuses. Vaigistamisel osaleb RENT kompleks, kuhu kuulub ka Sir2.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, milline osa valk Rpb9-st vastutab pärmi kromatiini normaalse vaigistamise eest.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud söötmed

Pagaripärmi tüvesid kasvatati YPD (*yeast extract, peptone, dextrose*; pärmiekstrakt-peptoonsööde) tard- ja vedelsöötmetes. YPD tardsööde sisaldas järgmist: agar 20 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, glükoos 20 g/l. Vedelsööde sisaldas: mükoloogiline peptoon 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l ja glükoos 20 g/l.

Et eristada transformeerunud rakud transformeerumata rakkudest, kontrolliti NTC-d (*Nourseothricin*; aminoglükosiidne antibiootikum) sisaldaval YPD tardsöötmetel *NAT*-i (*nourseothricin N-acetyl transferase*) ehk NTC resistentsusgeeni olemasolu.

Heterokromatiini vaigistamist uuriti tehes lahjenduskülvid saadud pagaripärmi tüvedega SC (*Synthetic complete*; sünteetiline täissööde), SC -TRP, SC -URA, SC 5-FoA (*5-Fluoroorotic Acid*), SC -ADE -ARG ja SC -ADE -ARG +Can (*canavanine*; kanavaniin) tardsöötmetele.

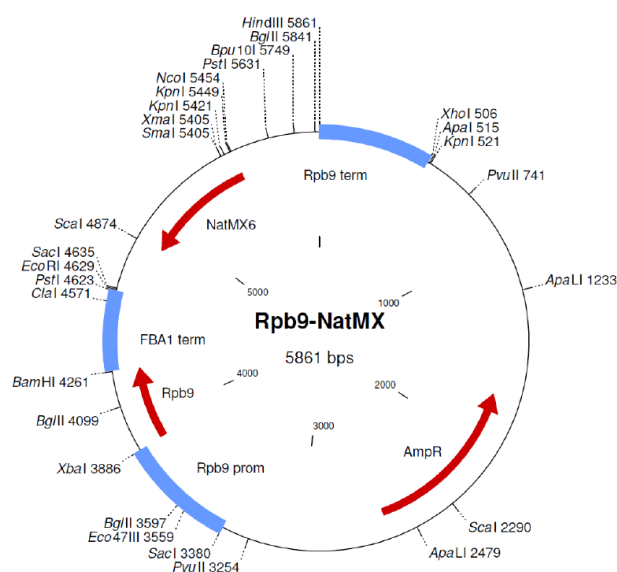
2.2.2. Kasutatud tüved ja plasmiidid

Erineva pikkusega Rpb9-t kodeeriv geen amplifitseeriti PCR-iga plasmidi Rpb9-NatMX (joonis 5 ja tabel 1) pealt ja viidi tüve nr 1456 (*alpha, hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535*), mis sisaldab endas vaigistamise uurimiseks vajalikke markergeene. Antud tüvi on pärit Kurt W. Runge'ilt (Lerner Research Institute, Cleveland, Ohio, USA).

Lisaks kasutati defektse vaigistamisega tüve (*sir2Δ*) nr 1493 (*alpha, alpha, hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535, sir2Δ*), mis on konstrueeritud Arnold Kristjuhani uurimisgrupi poolt.

Tabel 1. Üheksa erineva Rpb9-NatMX plasmidi iseloomustus.

Plasmiid	Kodeeritav geen
Rpb9-NatMX $\Delta N39$	<i>rpb9</i> $\Delta N39$
Rpb9-NatMX $\Delta N52$	<i>rpb9</i> $\Delta N52$
Rpb9-NatMX $\Delta C53$	<i>rpb9</i> $\Delta C53$
Rpb9-NatMX $\Delta C71$	<i>rpb9</i> $\Delta C71$
Rpb9-NatMX $\Delta C109$	<i>rpb9</i> $\Delta C109$
Rpb9-NatMX $\Delta N39, C109$	<i>rpb9</i> $\Delta N39, C109$
Rpb9-NatMX $\Delta N52, C109$	<i>rpb9</i> $\Delta N52, C109$
Rpb9-NatMX <i>rpb9</i> Δ	<i>rpb9</i> Δ



Joonis 5. Plasmiid Rpb9-NatMX. Plasmiid, mida kasutati Rpb9-t kodeeriva geeni amplifitseerimiseks. Kasutati üheksat erinevat plasmidi, mis erinesid geeni pikkuse poolest. Joonis on tehtud Clone Manager programiga.

2.2.3. PCR plasmidi Rpb9-NatMX pealt ja sadestamine

Üheksa Rpb9-NatMX plasmidi pealt amplifitseeriti geeni eripikkused lõigud koos markergeeniga kasutades järgnevaid praimereid:

RPB9_prom_F 5' TCATCC TTATGTGATGGTGCTG 3'

RPB9_term_R 5' TGAAGTATGTGAAGCCAGAAGATTA 3'

Reaktsioon viidi läbi 50 μ l-s, mis sisaldas 1 μ l vastavat Rpb9-NatMX plasmidi, 5 μ l $MgCl_2$, 5 μ l dNTP, 5 μ l 10XPfu puhvrit (*Fermenta*), 1 μ l kumbagi praimerit, 1 μ l 2,5 U/ μ l Pfu DNA polümeraasi (*Thermo Fisher Scientific*) ning 31 μ l mQ.

Kasutati järgnevat PCR programmi:

95° 5 min
95° 30 sek)
58° 30 sek } 30 tsüklit
72° 3 min)
72° 7 min

5 µl PCR produktile lisati 0,8 µl 6xLD (*loading dye*; laadimisvärv) kontrollimaks PCR edukust geelelektroforeesil.

45 µl PCR produktile lisati 4,5 µl 3 M NaAc ning 135 µl 96% EtOH. Segu jäeti vähemalt 20 min -80 kraadi juurde ning fuugiti seejärel 15 min 13 200 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415R*). Supernatant aspireeriti ning sademele lisati 135 µl külma 70% EtOH misjärel fuugiti 5 min 13 200 rpm. EtOH aspireeriti ja sademel lasti kuivada 37 kraadi juures umbes 10 min. Sade lahustati 25 µl mQ-s.

2.2.4. Transformeerimine elektroporatsiooniga

Pärmitüve 1456 kasvatati YPD vedelsöötmes 30 kraadi ja 200 rpm juures üleöö tiheduseni 1×10^8 rakku/ml. Rakud fuugiti maha 5 min 1500 rpm juures (*Sigma 4K 15C*, *rootor 272/F*) ja sööde eemaldati. Alles jäänud rakud suspendeeriti 10 ml steriilses TE-s [10 mM Tris; 1 mM EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*; etüleendiamiintetraatsetaat)] ning lisati 1 ml 1M LiAc. Rakud pandi 45 minutiks 30 kraadi juurde aeglaselt (100 rpm) loksuma, misjärel lisati 250 µl 1M DTT (*dithiothreitol*; ditiotreitool). Rakud jäeti veel 15 minutiks 30 kraadi juurde loksuma. Järgmisena lisati 40 ml H₂O ja fuugiti 5 min 1500 rpm. Rakke pesti kaks korda jääkülma veega ja fuugiti 5 min 1500 rpm. Siit alates hoiti rakke jääl. Rakud lahustati 1 ml jääkülmas sorbitoolis, kanti steriilsesse Eppendorfi topsi ning fuugiti maha 1 min 6000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415R*). Lisati samas hulgas sorbitooli ning fuugiti taas. Rakud lahustati 50 µl jääkülmas 1M sorbitoolis.

Poreerimiseks kanti 2 mm küvettidsse 40 µl rakke ja 10 µl sadestatud plasmiidi Rpb9-NatMX pealt saadud amplifitseeritud lõik. Poreerimiseks kasutati *BioRad Gene Pulser Xcell* poraatori *S. cerevisiae* vaikimisi parameetreid (C=25 mikroF; PC = 200 ohm; V=1500 V). Koheselt peale poreerimist suspendeeriti rakke küvetis 1 ml 1M jääkülma sorbitooliga.

Rakud tõsteti ümber Eppendorfi tuubi ja fuugiti maha 3 min 3000 rpm. Eemaldati vajalikul hulgal sorbitooli, et tuubi jääks umbes 200 µl rakkude segu. Rakud külvati YPD tardsöötmele (inkubeeriti 30 kraadi juures) ning päeva möödudes tembeldati NTC-d sisaldavale tardsöötmele.

2.2.5. Genoomse DNA eraldamine pärmi kolooniast ja transformeerunud kolooniate kontrollimine

Genoomse DNA eraldamiseks lisati ühest kolooniast võetud rakkudele 100 µl 0,2 M LiOAc + 1% SDS (*sodium dodecyl sulfate*; naatriumdodetsüülsulfaat) lahust ning tehti *vortex*. Rakke hoiti 10 min 70 kraadi juures. Seejärel lisati 300 µl EtOH (96%) ning tehti *vortex*. Peale 5 min 13 200 rpm juures fuugimist aspireeriti vedelik ja lasti etanoolil aurustuda 42 kraadi juures. Lisati 100 µl TE-d, tehti *vortex* ning *spin down*, misjärel jäi DNA vedelikku.

Selleks, et kontrollida, kas selektiivtassil kasvanud kolooniad sisaldavad tõepoolest Rpb9-t kodeeriva geeni õige pikkusega lõiku ja kas lõik on sisenenud genoomis õigesse kohta, viidi läbi PCR. Selleks kasutati järgnevaid primereid:

RPB9_ctrl 5' TCAATACGGTTTTTCAGCTCGT 3'

FBA1_ctrl_2 5' CGAACTCCAAAATGAGCTATC 3'

Reaktsioon viidi läbi 10 µl-s, mis sisaldas 1 µl kolooniast eraldatud DNA-d, 0,25 µl kumbagi praimerit, 2 µl 5xFIREPol® MasterMix (*Solis BioDyne*) ja 6,5 µl mQ.

PCR programm oli järgmine:

95° 5 min
95° 30 sek } 30 tsüklit
55° 30 sek }
72° 2 min }
72° 10 min }

Elektroforeesil võrreldi tüvede pikkuseid omavahel ning tehti järeldused transformatsiooni tulemuslikkuse kohta.

2.2.6. Vaigistamise uurimine ja lahjenduskülvid

Tüvi nr 1456, kuhu viidi erineva pikkusega aplifitseeritud lõigud, võimaldab uurida vaigistamist nii rDNA, paardumistüübi kui ka telomeeride juures.

Ribosomaalse DNA piirkonda on viidud *ADE2-CAN1* geenikassett. CAN1 on permeaas, mis on vajalik arginiini transportimiseks rakku. Kanavananiin on arginiini toksiline analoog – selle transport rakku on letaalne. Seega, kui vaigistamine on defektne ja sööde sisaldab kanavananiini, kasvu ei esine. Kontrollina kasvatati rakke adeniini ja arginiini mittesisaldaval sünteetilisel täissöötmel (SC -ADE -ARG).

Paardumistüübi lookusesse on sisestatud *TRP1* markergeen, mis on vajalik trüptofaani biosünteesis. Kui vaigistamine on defektne, siis suudab rakk kasvada trüptofaani mittesisaldaval söötmel. Kontrollina kasvatati rakke sünteetilisel täissöötmel (SC).

Telomeeride piirkonnas on *URA3* markergeen, mis on vajalik pürimidiinide biosünteesis. Kui *URA3* avaldub, siis ei suuda rakud kasvada söötmel, mis sisaldab 5-FoA-d, sest moodustub toksiline vaheühend. Seega normaalset vaigistamist näitab rakkude võime kasvada 5-FoA-d sisaldaval söötmel. Kontrollina kasvatati rakke uratsiili mittesisaldaval sünteetilisel täissöötmel (SC -URA).

Lahjenduskülviks viidi kõikide tüvede kontsentratsioon 10 000 rakuni/1 µl. Rakukultuuri tiheduse mõõtmiseks kasutati rakuloendurit (ZTM COULTER COUNTER[®] *Cell and Particle Counter. Beckman Coulter*). Edasi tehti 10-kordsete lahjenduste rida nii, et viimasesse lahjendusse jäaks 1 rakk 1 µl kohta. Igast lahjendusest külvati tassile 5 µl. Kõiki kaitseid tehti kaks korda.

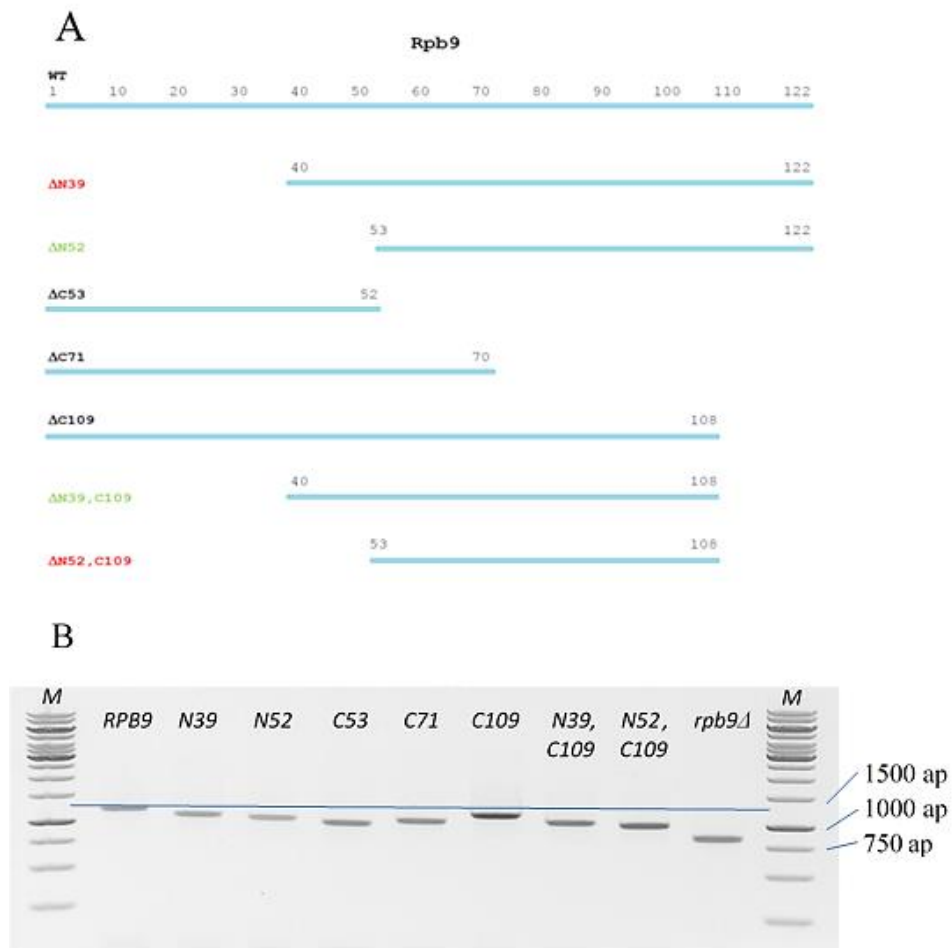
2.3. Tulemused

2.3.1. Erineva pikkusega deletsioonitüvede konstrueerimine

Töö käigus saadi üheksa uut tüve (vt tabel 2 ja joonis 6). Tüved erinevad üksteisest Rpb9-t kodeeriva geeni pikkuse poolest.

Tabel 2. Saadud tüvede genotüübid.

Tüvi	Genotüüp
1760	<i>alpha, hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535, RPB9</i>
1761	<i>alpha, hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535, rpb9 ΔN39</i>
1762	<i>alpha, hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535, rpb9 ΔN52</i>
1764	<i>alpha, hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535, rpb9 ΔC53</i>
1765	<i>alpha, hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535, rpb9 ΔC71</i>
1766	<i>alpha, hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535, rpb9 ΔC109</i>
1767	<i>alpha, hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535, rpb9 ΔN39, C109</i>
1768	<i>alpha, hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535, rpb9 ΔN52, C109</i>
1772	<i>alpha, hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535, rpb9Δ</i>



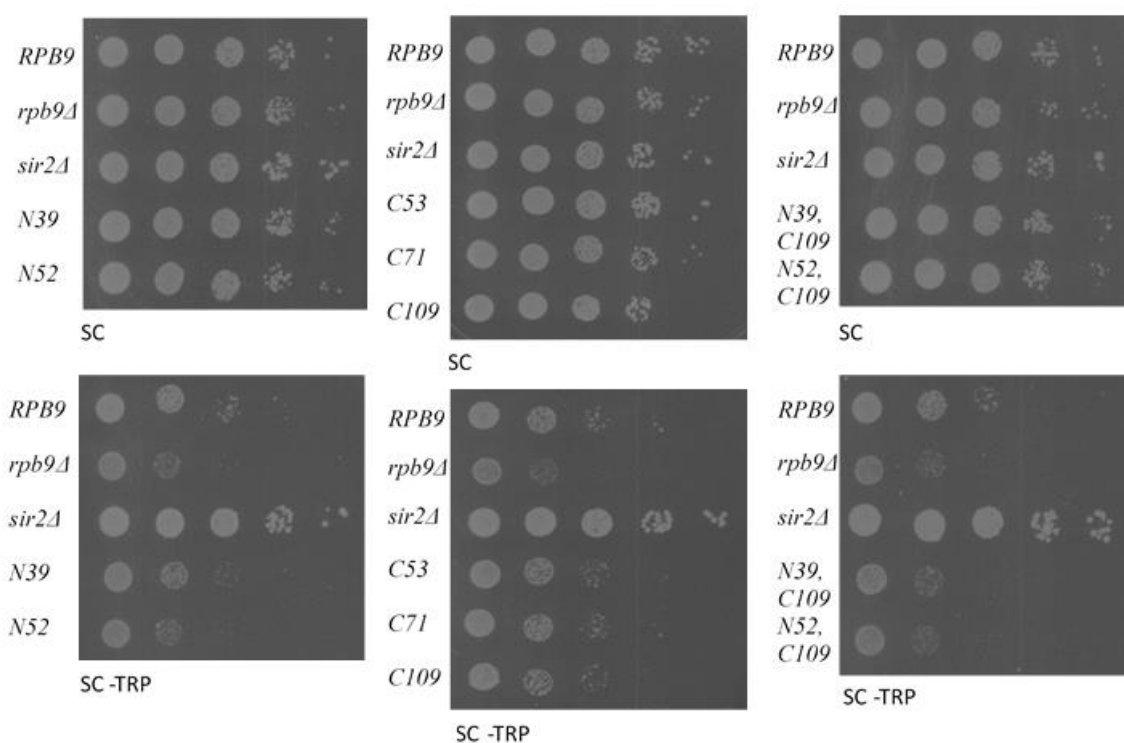
Joonis 6. (A) Valk Rpb9 erineva pikkusega lõigud. (B) PCR produktide võrdlus geelelektroforeesil. 1% geelile on kantud 10 μ l transformeerunud kolooniast saadud PCR produkti ja 3 μ l 1 kb markerit (M). *RPB9* on ligikaudu 1250 aluspaari pikk. *RPB9* ja *rpb9Δ* pikkuse vahe on 366 nukleotiidi.

2.3.2. Transkriptsiooniline vaigistamine paardumistüübi lookuses erinevate *RPB9* deletsioonidega rakkudes

Rpb9Δ ei mõjuta märkimisväärselt paardumistüübi lookuse vaigistamist. Võrreldes *sir2Δ*'ga, mille korral on vaigistamine defektne ning mis kasvab trüptofaani mittesisaldaval söötmel hästi, on kõigi deletsioonitüvede kasv SC -TRP tassil halb (joonis 7).

Kasvu esinemist võib seletada sellega, et paardumistüübi vaigistamise mõju ei ulatu nii kaugele. Lisatud *TRP1* marker pikendab vaigistatavat piirkonda. Seega võib mingil tasemel transkriptsioon siiski toimuda.

Täieliku deletsiooniga tüvi kasvab -TRP tassil halvemini kui metsiktüüp. N-terminuse deletsiooniga tüved sarnanevad samal tassil Δ -le ning C-terminuse omad metsiktüübile. Siit võib järeldada, et Rpb9 N-terminus on tähtsaim osa sellest subühikust. (joonis 7)

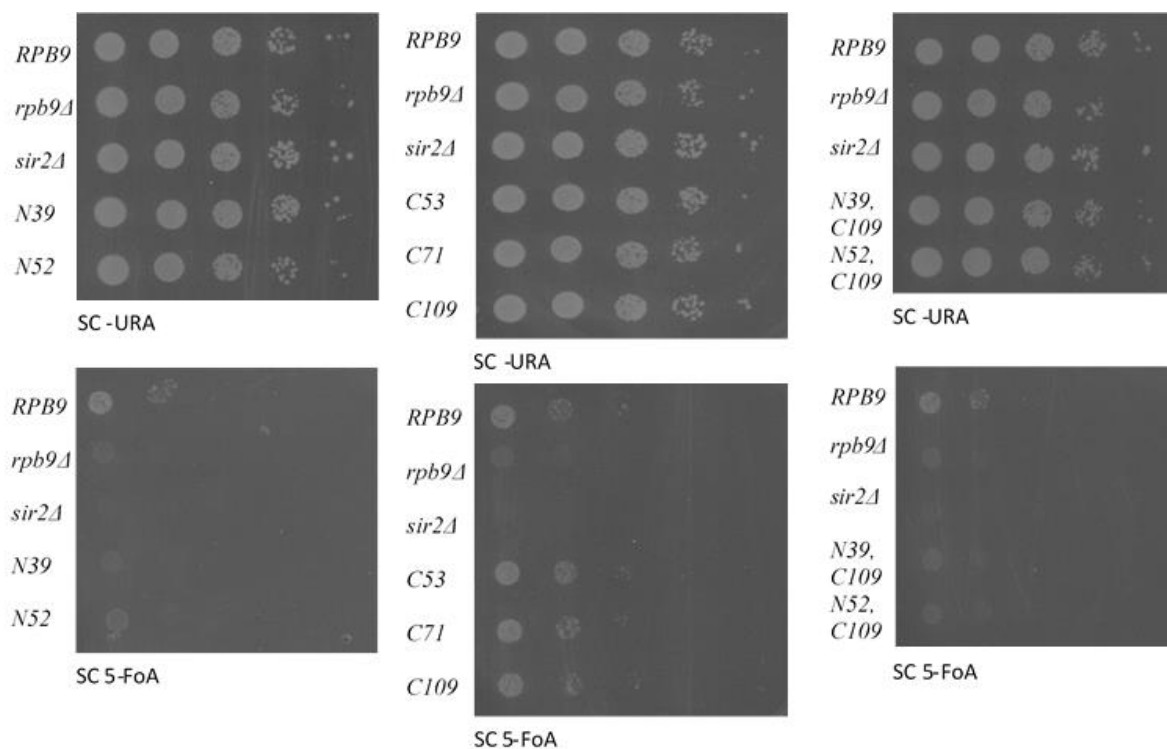


Joonis 7. Vaigistamine paardumistüübi lookuses. 10-kordsete vahedega lahjenduskülv. Defektset vaigistamist näitab hea kasv trüptofaani mittesisaldaval sünteetilisel täissöötmel (SC -TRP). Kontrollina kasvatati rakke kõiki aminohappeid sisaldaval sünteetilisel täissöötmel (SC)

2.3.3. Transkriptsiooniline vaigistamine telomeerses lookuses erinevate *RPB9* deletsioonidega rakkudes

Rpb9Δ põhjustab telomeerses lookuses defektset vaigistamist – *rpb9Δ*’l ei esine 5-FoA tassil kasvu, mis tähendab, et *URA3* avaldub ja 5-FoA-st sünteesitakse mürgine ühend.

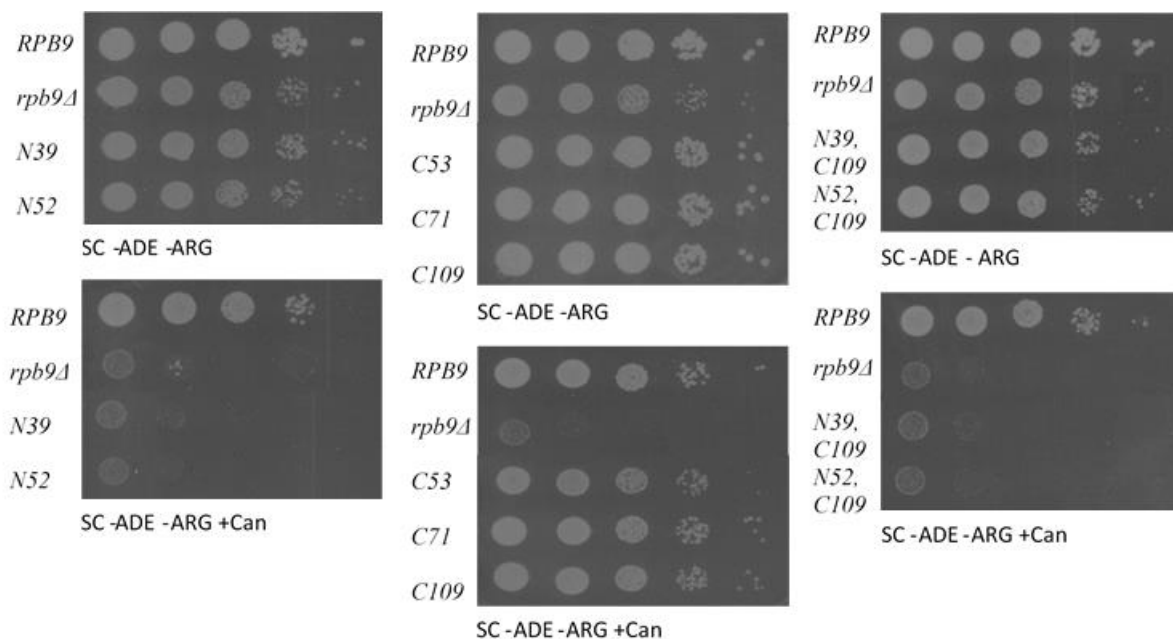
Rpb9 N-terminuse deletsioon 39 ja 52 aminohappe võrra põhjustab Δ fenotüüpi. C-terminuse deletsioon 69 aminohappe võrra ei tekita Δ fenotüüpi. Seega võib järeldada, et vaigistamiseks on oluline Rpb9 N-terminus. (joonis 8)



Joonis 8. Vaigistamine telomeeride juures. 10-kordsete vahedega lahjenduskülv. Defektset vaigistamist näitab kasvu puudumine 5-FoA-d sisaldaval sünteetilisel täissöötmel (SC 5-FoA). Kontrollina kasvatati rakke uratsiili mittedisaldaval sünteetilisel täissöötmel (SC -URA).

2.3.4. Transkriptsiooniline vaigistamine ribosomaalse DNA lookuses erinevate *RPB9* deletsioonidega rakkudes

Ribosomaalse DNA juures põhjustab *rpb9Δ* vaigistamise probleeme. Seda näitab väga halb kasv/kasvu puudumine kanavaniini sisaldaval tassil. *CAN1* on defektse vaigistamise tõttu avaldunud ja rakud transpordivad sisse toksilist kanavaniini. Taas põhjustab N-terminuse deletsioon 39 ja 52 aminohappe võrra Δ fenotüübi. C-terminuse deletsiooniga tüved on kasvu poolest identsed metsiktüüpi rakkudele. (joonis 9)



Joonis 9. Vaigistamine rDNA aladel. 10-kordsete vahedega lahjenduskülv. Defektset vaigistamist näitab kasvu puudumine adenüüni ja arginiini mittesisaldaval ning kanavaniini sisaldaval sünteetilisel täissöötmel (SC -ADE -ARG +Can). Kontrollina kasvatati rakke adenüüni ja arginiini mittesisaldaval sünteetilisel täissöötmel (SC -ADE -ARG)

KOKKUVÕTE

Antud töö eesmärgiks oli uurida, milline osa RNA polümeraas II subühik Rpb9-st on vastutav pärmi heterokromatiini normaalse vaigistamise eest.

Selleks konstrueeriti üheksa tüve, mis erinesid Rpb9 pikkuse poolest ja võimaldasid uurida vaigistamist kolmes lookuses.

Antud töö tulemusena võib öelda, et Rpb9 N-terminus on absoluutselt vajalik normaalseks vaigistamiseks rDNA ja telomeeride juures. Paardumistüübi lookuse vaigistamist ei mõjutanud märkimisväärselt ükski *Rpb9* modifikatsioon. C-terminuse erineva pikkusega deletsioonid ei mõjutanud vaigistamist üheski lookuses.

The role of RNA polymerase II subunit Rpb9 in heterochromatin silencing in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Katrin Orro

SUMMARY

RNA polymerase II is a vital component of the transcription machinery as it synthesizes mRNA from a DNA template. The multicomplex is made of 12 subunits. Rpb9, one of the smallest subunits, is not essential. However, deletion of *RPB9* can be associated with defects in transcription initiation, fidelity and transcriptional DNA reparation.

Transcriptional silencing in budding yeast occurs at three loci: rDNA, telomeres and mating-type. The mechanism is each is different. Transcriptional silencing depends on the location in the chromatin and not on the gene itself. Therefore, it is not the same as gene silencing.

The aim of this paper was to investigate which part of subunit Rpb9 causes defective silencing.

The results showed that deletion of the N-terminus of Rpb9 is responsible of silencing. Different deletions in C-terminus had no effect on silencing.

KIRJANDUSE LOETELU

- Acker, J., Wintzerith, M., Vigheron, M., and Kedinger, C. (1993). Structure of the gene encoding the 14.5 kDa subunit of human RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res.* *21*, 5345–5350.
- Allen, B.L., and Taatjes, D.J. (2015). The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 155–166.
- Armache, K.-J., Kettenberger, H., and Cramer, P. (2003). Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 6964–6968.
- Awrey, D.E., Weilbaecher, R.G., Hemming, S.A., Orlicky, S.M., Kane, C.M., and Edwards, A.M. (1997). Transcription Elongation through DNA Arrest Sites A MULTISTEP PROCESS INVOLVING BOTH RNA POLYMERASE II SUBUNIT RPB9 AND TFIIS. *J. Biol. Chem.* *272*, 14747–14754.
- Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D., and Broach, J.R. (1993). Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.* *7*, 592–604.
- Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2003). Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: Implications for the initiation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 6969–6973.
- Chen, X., Ruggiero, C., and Li, S. (2007). Yeast Rpb9 Plays an Important Role in Ubiquitylation and Degradation of Rpb1 in Response to UV-Induced DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 4617–4625.
- Edwards, A.M., Kane, C.M., Young, R.A., and Kornberg, R.D. (1991). Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *J. Biol. Chem.* *266*, 71–75.
- Furter-Graves, E.M., Hall, B.D., and Furter, R. (1994). Role of a small RNA pol II subunit in TATA to transcription start site spacing. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4932–4936.
- van Gool, A.J., Verhage, R., Swagemakers, S.M., van de Putte, P., Brouwer, J., Troelstra, C., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H. (1994). RAD26, the functional *S. cerevisiae* homolog of the Cockayne syndrome B gene ERCC6. *EMBO J.* *13*, 5361–5369.

- Gupta, K., Sari-Ak, D., Haffke, M., Trowitzsch, S., and Berger, I. (2016). Zooming in on Transcription Preinitiation. *J. Mol. Biol.* 428, 2581–2591.
- Haber, J.E. (2012). Mating-Type Genes and MAT Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191, 33–64.
- Hahn, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA Polymerase II transcription machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 394–403.
- Hantsche, M., and Cramer, P. (2016). The Structural Basis of Transcription: 10 Years After the Nobel Prize in Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 15972–15981.
- Harrison, D.A., Mortin, M.A., and Corces, V.G. (1992). The RNA polymerase II 15-kilodalton subunit is essential for viability in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 12, 928–935.
- Hemming, S.A., and Edwards, A.M. (2000). Yeast RNA Polymerase II Subunit RPB9 MAPPING OF DOMAINS REQUIRED FOR TRANSCRIPTION ELONGATION. *J. Biol. Chem.* 275, 2288–2294.
- Huang, J., and Moazed, D. (2003). Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing. *Genes Dev.* 17, 2162–2176.
- Hull, M.W., McKune, K., and Woychik, N.A. (1995). RNA polymerase II subunit RPB9 is required for accurate start site selection. *Genes Dev.* 9, 481–490.
- Kaine, B.P., Mehr, I.J., and Woese, C.R. (1994). The sequence, and its evolutionary implications, of a *Thermococcus celer* protein associated with transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3854–3856.
- Kimmerly, W.J., and Rine, J. (1987). Replication and segregation of plasmids containing cis-acting regulatory sites of silent mating-type genes in *Saccharomyces cerevisiae* are controlled by the SIR genes. *Mol. Cell. Biol.* 7, 4225–4237.
- Klar, A.J.S. (2010). The Yeast Mating-Type Switching Mechanism: A Memoir. *Genetics* 186, 443–449.

- Kobayashi, T. (2006). Strategies to maintain the stability of the ribosomal RNA gene repeats. *Genes Genet. Syst.* *81*, 155–161.
- Kobayashi, T. (2008). A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus—rDNA instability maintains genome integrity. *BioEssays* *30*, 267–272.
- Kobayashi, T. (2011). Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 1395–1403.
- Kobayashi, T., Heck, D.J., Nomura, M., and Horiuchi, T. (1998). Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev.* *12*, 3821–3830.
- Koyama, H., Ito, T., Nakanishi, T., and Sekimizu, K. (2007). Stimulation of RNA polymerase II transcript cleavage activity contributes to maintain transcriptional fidelity in yeast. *Genes Cells* *12*, 547–559.
- Lee, T.I., and Young, R.A. (2000). Transcription of Eukaryotic Protein-Coding Genes. *Annu. Rev. Genet.* *77*.
- Li, S., and Smerdon, M.J. (2002). Rpb4 and Rpb9 mediate subpathways of transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *21*, 5921–5929.
- Li, S., and Smerdon, M.J. (2004). Dissecting Transcription-coupled and Global Genomic Repair in the Chromatin of Yeast GAL1–10 Genes. *J. Biol. Chem.* *279*, 14418–14426.
- Li, S., Ding, B., Chen, R., Ruggiero, C., and Chen, X. (2006a). Evidence that the Transcription Elongation Function of Rpb9 Is Involved in Transcription-Coupled DNA Repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 9430–9441.
- Li, S., Chen, X., Ruggiero, C., Ding, B., and Smerdon, M.J. (2006b). Modulation of Rad26- and Rpb9-mediated DNA Repair by Different Promoter Elements. *J. Biol. Chem.* *281*, 36643–36651.
- Madhani, H.D. (2007). From a to α . *Yeast as a Model for Cellular Differentiation* (New York).

- Matsui, T., Segall, J., Weil, P.A., and Roeder, R.G. (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 255, 11992–11996.
- McKune, K., Richards, K.L., Edwards, A.M., Young, R.A., and Woychik, N.A. (1993). RPB7, one of two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II, is essential for cell viability. *Yeast Chichester Engl.* 9, 295–299.
- McKune, K., Moore, P.A., Hull, M.W., and Woychik, N.A. (1995). Six human RNA polymerase subunits functionally substitute for their yeast counterparts. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6895–6900.
- Nesser, N.K., Peterson, D.O., and Hawley, D.K. (2006). RNA polymerase II subunit Rpb9 is important for transcriptional fidelity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 3268–3273.
- Petes, T.D., and Botstein, D. (1977). Simple Mendelian inheritance of the reiterated ribosomal DNA of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5091–5095.
- Rusche, L.N., Kirchmaier, A.L., and Rine, J. (2003). The Establishment, Inheritance, and Function of Silenced Chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 481–516.
- Smith, J.S., and Boeke, J.D. (1997). An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev.* 11, 241–254.
- Thomas, M.C., and Chiang, C.-M. (2006). The General Transcription Machinery and General Cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41, 105–178.
- Vandre, C.L., Kamakaka, R.T., and Rivier, D.H. (2008). The DNA End-Binding Protein Ku Regulates Silencing at the Internal HML and HMR Loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 180, 1407–1418.
- Walmacq, C., Kireeva, M.L., Irvin, J., Nedialkov, Y., Lubkowska, L., Malagon, F., Strathern, J.N., and Kashlev, M. (2009). Rpb9 Subunit Controls Transcription Fidelity by Delaying NTP Sequestration in RNA Polymerase II. *J. Biol. Chem.* 284, 19601–19612.
- Weinstock, K.G., Mastrangelo, M.F., Burkett, T.J., Garfinkel, D.J., and Strathern, J.N. (1990). Multimeric arrays of the yeast retrotransposon Ty. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2882–2892.

Woychik, N.A., and Young, R.A. (1989). RNA polymerase II subunit RPB4 is essential for high- and low-temperature yeast cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2854–2859.

Woychik, N.A., Lane, W.S., and Young, R.A. (1991). Yeast RNA polymerase II subunit RPB9 is essential for growth at temperature extremes. *J. Biol. Chem.* 266, 19053–19055.

Yudkovsky, N., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408, 225–229.

Ziegler, L.M., Khapersky, D.A., Ammerman, M.L., and Ponticelli, A.S. (2003). Yeast RNA Polymerase II Lacking the Rpb9 Subunit Is Impaired for Interaction with Transcription Factor IIF. *J. Biol. Chem.* 278, 48950–48956.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Katrin Orro (sünnikuupäev 25.05.1996),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose „RNA polümeraas II subühiku Rpb9 roll heterokromatiini vaigistamisel pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae*“, mille juhendaja on Henel Sein,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018